

High density test plate and process of making

Patent Number: ☐ US6030829
Publication date: 2000-02-29
Inventor(s): DANNOUX THIERRY LUC ALAIN (FR); PUJOL GILBERT DOMINIQUE (FR); ROOT DAVID MARTIN (US)
Applicant(s): CORNING INC (US)
Requested Patent: ☐ FR2741357
Application Number: US19960747425 19961120
Priority Number(s): FR19950013878 19951122
IPC Classification: C12M1/34
EC Classification: C03B11/06, C03B11/08B, C03B23/00C, C03B23/02, C12M1/34H, C03B11/08
Equivalents: DE69609345D, DE69609345T, ☐ EP0862540 (WO9719027), B1, JP2000504299T, ☐ WO9719027

Abstract

A support plate and method of making a support plate for biological or chemical testing or cell culture. The plate has a high density network of microwells formed therein. The wells are formed by a contact pressing technique whereby a network of protuberances are pressed into the surface of a thermoformable material.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 741 357

(21) N° d'enregistrement national : 95 13878

(51) Int Cl⁶ : C 12 M 3/00

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 22.11.95.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 23.05.97 Bulletin 97/21.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : CORNING INCORPORATED — US.

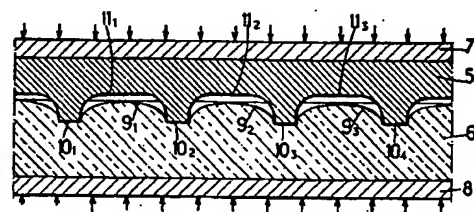
(72) Inventeur(s) : DANNOUX THIERRY, PUJOL
GILBERT et ROOT DAVID MARTIN.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : CABINET DE BOISSE.

(54) PROCÉDE DE FABRICATION D'UNE PLAQUETTE DE SUPPORT D'UN RESEAU BIDIMENSIONNEL DE
MICROPUITS, NOTAMMENT POUR ESSAIS OU CULTURES BIOLOGIQUES.

(57) Suivant ce procédé, a) on forme une matrice (5; 5) de
pressage en un matériau indéformable présentant une sur-
face dont débordent un réseau bidimensionnel de protubé-
rances (4) isolées les unes des autres et présentant des
extrémités conformes aux fonds de micropuits à former,
ces protubérances étant de hauteur supérieure à la profon-
deur desdits micropuits (10), b) on presse contre ladite sur-
face de matrice (5; 5) une plaquette (6; 6) en un matériau
thermoformable chauffé au-dessus de sa température de
ramollissement de manière que seules les protubérances
(4) viennent en contact avec ladite plaquette et s'enfoncent
ensuite dans celle-ci sur une profondeur égale à celle de
micropuits (10) à former dans cette plaquette et inférieure
à la hauteur de ces protubérances, et c) on refroidit ladite
plaque (6; 6) pour obtenir sur celle-ci un réseau stable de
micropuits.



FR 2 741 357 - A1



La présente invention est relative à un procédé de fabrication d'une plaquette de support d'un réseau bidimensionnel de micropuits, plus particulièrement destiné à la réalisation d'essais ou de cultures biologiques. La présente invention est aussi relative à la plaquette de micropuits obtenue par la mise en œuvre de ce procédé.

Pour pratiquer des essais ou des cultures biologiques, on utilise aujourd'hui couramment des plaquettes moulées dans des matières thermoplastiques telles qu'un polycarbonate ou du polystyrène, ces plaquettes comportant 96 cavités ou puits propres à recevoir, par exemple, des cellules à cultiver et leur milieu nutritif. Typiquement la plaquette est rectangulaire, de format 80 x 125 mm environ et les puits présentent un diamètre de 8 mm environ. Ces dimensions prêtre de 8 mm environ. Ces dimensions sont standardisées de manière à permettre la manipulation automatiques des plaquettes dans des appareils tels qu'un robot manipulateur de liquide, un spectrophotomètre ou un microscope d'observation.

Lorsqu'on utilise de telles plaquettes pour réaliser des manipulations génétiques telles que la greffe d'une "sonde" sur un segment de molécule d'ADN par exemple, le grand volume du puits par rapport aux dimensions d'une cellule contenant une telle molécule rend faible, du fait de la concentration relative, la probabilité d'interaction de la sonde et de la molécule. En outre, le petit nombre (96) des puits limite le nombre d'essais ou de cultures réalisables sur une même plaquette.

Le remplissage des puits se fait actuellement à l'aide d'ensembles de pipettes de coût de réalisation élevé et exigeant un personnel spécialisé pour être manipulés. Chaque puits reçoit un grand nombre de cellules. La greffe d'une sonde sur la molécule d'ADN de

l'une d'entre elles s'opère alors d'une manière aléatoire
alors qu'il serait préférable que cette greffe se réalise
entre une sonde et une cellule unique, disposées à
proximité l'une de l'autre dans un puits de faibles
5 dimensions pour accroître la probabilité de réalisation de
la greffe.

L'observation des cultures s'opère par le fond des
puits, constitué par une membrane transparente ou une
paroi texturée ou poreuse telle qu'une trame ou une toile.
10 De tels moyens de constitution des fonds des puits peuvent
empêcher une observation en lumière polarisée, souvent
souhaitée, notamment dans le cas de membranes en matière
plastique susceptibles de perturber la polarisation du
faisceau d'observation.

15 On réalise couramment les plaquettes évoquées ci-
dessus par moulage par injection d'une matière plastique.
On sait qu'un tel moulage implique souvent l'utilisation
d'additifs, tels que des lubrifiants (paraffine, par
exemple) pour améliorer les propriétés d'écoulement de la
20 matière plastique. Un tel additif peut exsuder ensuite
dans les puits en perturbant les cultures. D'autres
additifs tels que des produits de stabilisation de la
matière plastique vis-à-vis des rayonnements ultraviolets,
peuvent aussi exsuder en empoisonnant les cultures
25 cellulaires. D'autre part, nombre de matières plastiques
manifestent une fluorescence qui parasite l'observation
des essais.

On connaît aussi un procédé de réalisation d'une
plaquette en silicium creusée, par un procédé classique de
30 gravure utilisé dans la fabrication de circuits intégrés,
d'un réseau bidimensionnel de puits de très petit
diamètre, ou "micropuits", la densité de ces micropuits
par unité de surface étant très supérieure à celle des
puits des plaquettes 80 x 125 mm décrites ci-dessus. Les
35 micropuits peuvent être remplis par mouillage d'une

surface étendue de la plaquette puis dé mouillage de celle-ci avec retrait du liquide déposé au fond des micropuits. Les micropuits sont généralement tronconiques et leurs bases sont délimitées par des arêtes vives qui s'opposent
5 au dé mouillage de la surface de la plaquette en bloquant des gouttes du liquide qui s'écoulent sur la surface de la plaquette pendant ce dé mouillage.

De telles plaquettes en silicium sont fragiles, et leur fabrication délicate, longue et coûteuse. En outre,
10 le silicium étant un matériau particulièrement opaque, il n'est pas possible de réaliser des observations ou mesures optiques à travers le fond des micropuits.

D'autres techniques peuvent être envisagées pour réaliser des plaquettes creusées d'un réseau dense de
15 micropuits, par exemple le moulage par injection d'une matière thermoplastique tel qu'un polycarbonate. La fluorescence de ce matériau et l'incorporation, classique dans celui-ci, de lubrifiants et de stabilisateurs aux rayons ultraviolets, le rend impropre à l'application
20 envisagée ici. On peut penser aussi à procéder par usinage au laser, pour réaliser des microperçages d'un substrat. Mais alors, on observe sur celui-ci des bavures et une rugosité telle que l'état de surface de la plaquette obtenue est propice au piégeage de bulles et n'offre pas
25 la qualité requise pour permettre son dé mouillage.

La présente invention a donc pour but de fournir un procédé de fabrication d'une plaquette supportant un réseau bidimensionnel très dense de micropuits de très petites dimensions, de l'ordre de celles de cellules
30 vivantes qu'elles doivent accueillir, assurant un remplissage aisé d'au moins certains des micropuits avec un petit nombre de cellules par micropuits, le nombre des puits formés sur la plaquette pouvant être très grand pour autoriser la réalisation d'un grand nombre de cultures
35 microbiologiques sur une même plaquette.

La présente invention a aussi pour but de fournir un tel procédé permettant de réaliser des plaquettes de micropuits réalisées en un matériau présentant une grande neutralité chimique en surface, ne contenant ou n'exsudant
5 aucun produit susceptible de perturber les cultures ou de gêner leur observation.

On atteint ces but de l'invention, ainsi que d'autres qui apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, avec un procédé de fabrication d'une plaquette de
10 support d'un réseau bidimensionnel de micropuits pour cultures microbiologiques, remarquable en ce que a) on forme une matrice de pressage en un matériau indéformable présentant une surface dont déborde un réseau bidimensionnel de protubérances isolées les unes des
15 autres et présentant des extrémités conformes aux fonds des micropuits à former, ces protubérances étant de hauteur supérieure à la profondeur desdits micropuits, b) on presse contre ladite surface de matrice une plaquette en un matériau thermoformable chauffé au-dessus de sa
20 température de ramollissement de manière que seules les protubérances viennent en contact avec ladite plaquette et s'enfoncent ensuite dans celle-ci sur une profondeur égale à celle de micropuits à former dans cette plaque, et inférieure à la hauteur de ces protubérances, et c) on
25 refroidit ladite plaque pour obtenir sur celle-ci un réseau stable de micropuits.

Comme on le verra dans la suite, ce procédé permet de réaliser, de manière peu coûteuse, dans un matériau inerte et transparent tel que du verre, un réseau de micropuits
30 propre à recevoir des cellule à cultiver en relation de proximité étroite avec des sondes, conformément à un des buts essentiels de l'invention. Le réseau peut être très dense et compter, par exemple, 10⁴ fois plus de puits que la plaquette 80 x 125 mm évoquée ci-dessus sur la même
35 surface, ce qui permet de multiplier les cultures. A titre

d'exemple illustrat. et non limitatif, on peut ainsi fabriquer un réseau micropuits distants de 100 μm environ les uns des autres, ces puits présentant une profondeur de 20 μm et un diamètre au fond de 40 μm ,
5 permettant d'accueillir une cellule à cultiver de 10 μm par exemple. Comme on le verra aussi dans la suite, le remplissage des micropuits s'opère par un processus de mouillage-démouillage particulièrement commode et efficace.

10 Suivant une autre caractéristique du procédé selon l'invention, on forme la matrice de pressage par gravure chimique d'une plaquette métallique, à travers un masque constitué par une trame de plages centrées sur les axes des protubérances à obtenir.

15 Suivant une variante avantageuse du procédé selon l'invention, on forme une pluralité de matrices, on empile celles-ci en intercalant entre deux matrices adjacentes une plaquette en matériau thermoformable et on presse à chaud l'ensemble de la pile ainsi formée pour obtenir une
20 pluralité de plaquettes creusées chacune d'un réseau de micropuits.

Le procédé suivant l'invention permet d'obtenir une plaquette qui porte sur au moins une de ses faces un réseau de micropuits à section axiale en entonnoir
25 s'évasant à partir du fond du micropuits, ces fonds étant séparés par des surfaces convexes en tout point et dépourvues de toute discontinuité de courbure, ces surfaces présentant en outre un fini de qualité optique. Cette géométrie et ce fini contribuent à concentrer au
30 fond des micropuits les produits liquides ou autres déposés sur la plaquette.

D'autres caractéristiques et avantages du procédé et de la plaquette suivant l'invention apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre et à l'examen du
35 dessin annexé dans lequel :

- la figure 1 est une vue en coupe schématique et agrandie d'une partie d'une matrice de pressage utilisée dans le procédé suivant l'invention, cette vue illustrant également son procédé de fabrication,

5 - la figure 2 illustre schématiquement le procédé de fabrication du réseau de micropuits suivant l'invention,

 - la figure 3 illustre schématiquement une variante avantageuse du procédé de fabrication représenté à la figure 2, permettant de réaliser simultanément plusieurs
10 réseaux,

- la figure 4 est une vue agrandie et en coupe d'une partie d'une plaquette suivant l'invention, comportant deux réseaux de micropuits formés chacun sur l'une de ses deux faces opposées,

15 - la figure 5 est une image prise au microscope électronique à balayage, d'une partie de la surface de la matrice utilisée dans le procédé suivant l'invention, et

 - la figure 6 est une vue prise au microscope mécanique à balayage d'une partie d'une plaquette obtenue
20 par la mise en œuvre du procédé selon l'invention.

Ainsi qu'on l'a indiqué plus haut, le procédé de fabrication d'une plaquette de support d'un réseau de micropuits suivant l'invention fait appel à une matrice permettant de former ces micropuits par pressage d'une
25 plaquette en un matériau thermoformable chauffé au-dessus de sa température de ramollissement. Ce matériau peut être un matériau vitreux tel que du verre ou une matière plastique transparente.

Pour réaliser cette matrice on part, suivant un mode
30 de mise en œuvre préféré de l'invention, d'une plaquette 1 en un alliage métallique stable tel que le Nicrimphy de IMPHY SA.

On recouvre une face de la plaquette métallique 1 d'une résine photosensible que l'on expose et que l'on
35 dépouille, par une technique classique de

photolithographie, de manière à laisser demeurer sur la surface de la plaquette un masque présentant la forme d'une trame régulière de plages telles que celles référencées $3_1, 3_2, 3_3, \dots$ à la figure 1, de forme
5 sensiblement circulaire par exemple.

On grave ensuite chimiquement la plaquette 1 à travers ce masque, à l'aide d'une solution de gravure qui n'attaque pas la résine des plages 3_1 . Pour graver du Nicrimphy, on peut utiliser une solution de perchlorure de
10 fer additionnée de 20 à 30 % d'acide nitrique. On sait que l'attaque isotrope du métal de la plaquette 1 par la solution de gravure dissout le métal se trouvant sous une plage 3_1 sur une distance H égale à la profondeur recherchée de la gravure. Si on désire alors faire
15 apparaître à la surface de la plaquette 1 un réseau de protubérances 4_1 de diamètre terminal d, il faut alors exposer la résine photosensible de manière à faire apparaître, après dépouillement, des plages 3_1 de résine de diamètre D tel que :

$$20 \quad D \cong d + 2H.$$

La gravure du métal étant terminée, les plages 3_1 de résine sont enlevées avec un solvant convenable et la surface gravée de la plaquette 1 a alors l'aspect illustré par la vue de la figure 5, prise au microscope
25 électronique à balayage. Sur cette vue, apparaît un réseau régulier de protubérances 4_1 s'évasant à partir de leur extrémité pour rejoindre un fond dont la rugosité est apparente sur la vue présentée.

La plaquette 1 ainsi gravée constitue une matrice de
30 pressage 5 utilisable dans le procédé de fabrication de plaquettes de micropuits selon l'invention, illustré à la figure 2. Typiquement, les protubérances sont distantes de 100 à 200 μm environ, hautes de 20 à 50 μm et de diamètre d'extrémité compris entre 20 et 50 μm .

Pour ce faire, comme représenté schématiquement à cette figure, on applique la face gravée de la matrice 5 contre une plaquette 6 en un matériau thermoformable chauffé à une température suffisante pour qu'elle présente une plasticité ou viscosité convenant à son pressage. Ce matériau peut être une matière plastique ou, plus préférentiellement, du verre tel que celui référence 7059 dans les catalogues de la société Corning Incorporated. Dans ce dernier cas, la matrice 5 et la plaquette 6 en verre sont placées dans un four et portées progressivement à une température de 740° C, de manière que le verre présente une viscosité de 10¹⁰ poises environ. A cette viscosité, une mise en pression convenable de l'ensemble matrice 5-plaquette 6 à l'aide de plaques de pression 7,8, pendant 1 minute environ, fait pénétrer les protubérances 4_i de la matrice dans la plaquette 6 de verre sur une profondeur que l'on peut contrôler pour que les éléments de surface de verre 9₁, 9₂, 9₃ ... qui séparent les puits 10₁, 10₂, 10₃ ... creusés par les protubérances 4_i dans la plaquette 6 à l'état plastique, conserve un fini "optique" du fait de l'absence de tout contact avec les éléments de surface 11₁, 11₂, ... du fond relativement rugueux de la matrice.

Après refroidissement de la plaquette 6 à la température ambiante, celle-ci porte un réseau bidimensionnel régulier de micropuits 10_i tel que ceux apparaissant sur la figure 6, qui est une vue de la surface de la plaquette prise au microscope mécanique à balayage.

Sur cette vue, il apparaît que les puits présentent une forme d'entonnoir s'évasant régulièrement, du fond des puits vers leurs débouchés sur la surface de la plaquette, les fonds étant séparés par des surfaces convexes en tout point, dépourvues de toute discontinuité de courbure, et présentant un fini de qualité optique. On remarquera que

ces surfaces convergent régulièrement vers les fonds des micropuits adjacents.

Grâce à ces propriétés de forme et de surface, il est aisé de remplir les micropuits avec des cellules à cultiver véhiculées par exemple dans un milieu nutritif. Une goutte d'un milieu ainsi chargé de cellules étant déposée à la surface de la plaquette de manière à "mouiller" celle-ci, le milieu et les cellules sont "aspirés" vers les fonds des puits par un processus de "démouillage" des surfaces courbes et lisses bordant les puits. L'excédent peut être évacué par évaporation contrôlée. La plaquette est ensuite protégée par une lamelle de verre.

Le procédé suivant l'invention permet de réaliser des plaquettes portant une très grande densité de micropuits, par exemple 10^4 puits par cm^2 . On peut garnir alors simultanément, par le processus de mouillage-démouillage décrit ci-dessus, un très grand nombre de micropuits avec des cellules à cultiver et leur milieu nutritif, les "sondes" ayant été au préalable déposées selon une cartographie prédéterminée dans les puits. Typiquement, à titre d'exemple, les micropuits peuvent présenter une profondeur de 15 à 30 μm , le diamètre du fond des puits se situant dans le domaine 20-50 μm et le pas des puits étant de 100 à 200 μm environ. On comprend qu'une cellule, typiquement de 10 μm environ, se trouve alors au fond d'un puits en très grande proximité avec des sondes introduites au préalable dans ce puits, ce qui accroît très avantageusement la probabilité de la greffe recherchée.

Une texturation du fond des micropuits facilite l'aspiration et la retenue des cellules et gouttes de liquide déposées à la surface de la plaquette de micropuits. Cette texturation peut être obtenue, selon l'invention, par un laminage, un brossage, un polissage, un satinage, un microbillage, un bombardement ionique, par

exemple, de la surface de la plaquette métallique utilisée pour réaliser la matrice de pressage, avant le dépôt de la résine photosensible destinée à la formation du masque de gravure. Ainsi, les faces d'extrémité des protubérances 4, 5 formées ensuite par gravure chimique portent une texture dont la réplique s'imprime sur le fond des micropuits lors du pressage de la plaquette 6 suivant l'invention.

Les faces d'extrémité des protubérances pourraient aussi être creusées, par gravure au laser "Eximer" par exemple, de marques de repérage telles que chiffres ou codes à barres par exemple, marques dont la réplique se reporte sur les fonds des micropuits au moment du pressage de la plaquette, comme décrit ci-dessus. Le repérage des diverses cultures portées par la plaquette est facilité 15 par ces moyens.

La plaquette de micropuits selon l'invention peut porter d'autres marques permettant la mise en repérage automatique de la plaquette dans des appareils de manipulation ou de traitement. Ces marques peuvent aussi 20 être formées, lors du pressage, par réplique de marques correspondantes formées sur la matrice.

On remarquera que la présente invention permet de faire en sorte que les fonds des puits d'une même plaquette soient tous coplanaires, ce qui facilite la mise 25 au point d'un microscope d'observation de ces cultures.

A cet égard, le réseau de micropuits peut comporter des lignes ou des colonnes de micropuits présentant des fonds de forme, par exemple ovale, différente de celle des autres (par exemple circulaire). Ces lignes et colonnes, 30 régulièrement distribuées, assurent un maillage du réseau observable au microscope, qui facilite l'exploration de ce réseau et le repérage des cultures pratiquées dans les micropuits.

Des techniques de pressage autres que le pressage 35 statique illustré à la figure 2 pourraient être utilisées

pour fabriquer la plaquette de micropuits suivant l'invention, par exemple un laminage, un soufflage ou une aspiration d'une matière à l'état plastique, contre une matrice suivant l'invention.

On a illustré à la figure 3 une variante du procédé suivant l'invention. Suivant cette variante, on réalise plusieurs matrices $5_1, 5_2, 5_3, \dots$ qu'on empile en intercalant une plaquette $6_1, 6_2, 6_3, \dots$ en matière thermoplastique entre deux matrices adjacentes. On chauffe et on presse ensuite l'ensemble comme décrit ci-dessus en liaison avec la figure 2. Cette variante présente deux avantages : d'une part elle accroît la productivité du procédé et, d'autre part, elle améliore la régularité des pressages réalisés sur les diverses plaques 6_i par l'effet de "matelas" qui résulte de l'empilage des plaquettes, effet favorable à l'uniformisation de la pression appliquée aux plaquettes.

On a représenté à la figure 4 une variante de la plaquette de micropuits suivant l'invention, par une coupe de cette plaquette suivant un plan perpendiculaire à sa surface. La coupe représentée fait apparaître que chacune des deux faces de la plaquette $6'$ porte un réseau de micropuits $10_1, 10_2, \dots$ et $11_1, 11_2, \dots$ respectivement. Le réseau de micropuits 10_i est sensiblement conforme à celui de la plaquette de la figure 2. Les micropuits 11_i formés sur l'autre face de la plaquette sont centrés chacun sur l'axe d'un micropuits 10_i . Ils sont dimensionnés de manière à recevoir un moyen de traitement (par chauffage par exemple) ou d'observation de la culture opérée dans le micropuits 10_i correspondant. Ce moyen peut prendre la forme d'une ou plusieurs fibres optiques 12 par exemple dans le cas d'analyses automatiques par fluorescence ou colorimétrie.

Les deux réseaux de micropuits peuvent être utilisés pour réaliser des cultures. Des plaquettes de verre plat

appliquées contre les réseaux de micropuits peuvent protéger les cultures qui y sont développées.

Il apparaît maintenant que la présente invention permet bien d'atteindre les buts, et d'obtenir les
5 avantages, que l'on s'était fixés. C'est ainsi que, grâce à la grande densité de micropuits formés dans une plaquette et à la géométrie de ces micropuits, bordés de surfaces bombées convergeant vers les fonds des puits adjacents, on peut remplir aisément un grand nombre de
10 puits avec les milieux liquides et cellules nécessaires à une culture microbiologique de ces cellules, à des fins de génie génétique par exemple.

Le matériau utilisé préférentiellement pour constituer la plaquette, à savoir le verre, autorise,
15 contrairement à la plupart des matières plastiques, des observations des cultures aussi bien en lumière polarisée qu'en lumière naturelle, non perturbées par des fluorescences parasites.

La grande inertie chimique du verre autorise l'emploi
20 d'acétone nécessaire à la fixation des cellules, ou l'utilisation de colorants comme, par exemple l'hématoxyline, nécessaire à l'observation du contenu des noyaux, en même temps qu'elle évite toute pollution par des produits issus de la matière de la plaquette.

25 L'excellente stabilité dimensionnelle du verre apporte plusieurs autres avantages : grand précision (de l'ordre du micromètre) du repérage des puits sur les plaquettes, ainsi que du positionnement des plaquettes dans les machines de manipulation de traitements, mise au
30 point aisée d'un microscope d'observation sur les fonds plans et coplanaires des puits.

A l'aide d'un tampon de velours, on peut transférer simultanément une partie du contenu de chaque puits pour les reporter sur une autre plaquette, ce qui permet la
35 copie de ces cultures.

La forme évasée des micropuits permet à d'éventuels microbulles d'air de s'échapper des puits plutôt que d'y rester accrochées en perturbant les cultures et les observations dont elles font l'objet.

5 La très faible dimension des micropuits permet de pratiquer dans chacun des cultures monocellulaires, ou d'un très petit nombre de cellules, autorisant l'obtention de clones dont la paternité est sûre. Cette faible dimension des puits augmente les concentrations relatives
10 et favorise la probabilité d'interaction des sondes (fragments d'ADN) avec les molécules d'ADN sur lesquelles une greffe doit s'opérer.

L'amplification en chaîne par polymérase, communément appelée PCR, qui nécessite un cyclage thermique, ne serait
15 pas possible "in situ" avec les plaquettes en matière thermoplastique (par exemple le polystyrène), actuellement utilisées pour les cultures cellulaires, mais devient possible avec une plaquette en verre, du fait de la très bonne résistance de ce matériau à de tels cyclages.

20 Enfin, de manière particulièrement avantageuse, l'invention permet de fabriquer des plaquettes de support de réseaux très denses de micropuits, par un procédé de pressage autorisant une fabrication desdites plaquettes à des cadences industrielles et à des prix de revient de
25 fabrication particulièrement bas.

Bien entendu l'invention n'est pas limitée au mode de réalisation décrit ou représenté, qui n'a été donné qu'à titre d'exemple. C'est ainsi que la plaquette suivant l'invention pourrait aussi être réalisée avec diverses
30 matières plastiques, dans la mesure où les problèmes de pollution ou de difficultés d'observation des cultures évoquées ci-dessus ne se posent pas dans les conditions d'utilisation d'une telle plaquette. On pourrait également utiliser un métal ductile déformable plastiquement, s'il
35 n'est pas prévu de réaliser des observations à travers les

fonds des micropuits. En outre, l'invention trouve application, non seulement à la réalisation de cultures biologiques, mais aussi à la réalisation de tout essai ou traitement de microéchantillons de matières quelconques.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de fabrication d'une plaquette de support d'un réseau bidimensionnel de micropuits pour essais ou cultures biologiques, caractérisé en ce que :

5 a) on forme une matrice (5 ; 5_i) de pressage en un matériau indéformable présentant une surface dont déborde un réseau bidimensionnel de protubérances (4_i) isolées les unes des autres et présentant des extrémités conformes aux fonds de micropuits à former, ces protubérances étant de
10 hauteur supérieure à la profondeur desdits micropuits (10_i),

 b) on presse contre ladite surface de matrice (5 ; 5_i) une plaquette (6 ; 6_i) en un matériau thermoformable chauffé au-dessus de sa température de ramollissement de
15 manière que seules les protubérances (4_i) viennent en contact avec ladite plaquette et s'enfoncent ensuite dans celle-ci sur une profondeur égale à celle de micropuits (10_i) à former dans cette plaquette et inférieure à la hauteur de ces protubérances, et

20 c) on refroidit ladite plaque (6 ; 6_i) pour obtenir sur celle-ci un réseau stable de micropuits.

2. Procédé conforme à la revendication 1, caractérisé en ce qu'on forme la matrice (5 ; 5_i) par gravure chimique d'une plaquette métallique, à travers un masque constitué
25 par une trame de plages (3_i) centrées sur les axes des protubérances à obtenir.

3. Procédé conforme à l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'on presse contre ladite matrice (5 ; 5_i) une plaquette en verre.

30 4. Procédé conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que, avant de former des protubérances (4_i) sur la matrice, on texture la surface à partir de laquelle on forme ces protubérances, par l'un quelconque des procédés du groupe formé par : le

laminage, le polissage, le satinage, le microbillage, le bombardement ionique.

5. Procédé conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on forme sur
5 les extrémités des protubérances (10_i) de la matrice (5 ; 5_i) des marques de repérage en relief.

6. Procédé conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on forme une pluralité de matrices (5_i), on empile celles-ci en
10 intercalant entre deux matrices adjacentes une plaquette (6_i) en matériau thermoformable et on presse à chaud l'ensemble de la pile ainsi formée pour obtenir une pluralité de plaquettes creusées chacune d'un réseau de micropuits (10_i).

15 7. Procédé conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on presse simultanément les deux faces d'une plaquette en matériau thermoformable contre deux matrices de protubérances, ces matrices étant disposées de manière que chaque
20 protubérance (10_i) de l'une soit coaxiale à une protubérance (11_i) de l'autre.

8. Procédé conforme à l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on presse la matrice (5 ; 5_i) contre la plaquette (6 ; 6_i) par l'un
25 des procédés du groupe formé par : le pressage statique, le laminage, le soufflage, l'aspiration.

9. Procédé conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'on utilise une matrice dont les protubérances sont distantes de 100 à
30 200 µm environ, hautes de 20 à 50 µm et de diamètre d'extrémité compris entre 20 et 50 µm.

10. Plaquette de support d'un réseau bidimensionnel de micropuits obtenue par le procédé de fabrication conforme à la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle
35 porte, sur au moins une de ses faces, un réseau de

micropuits (10_i), à section axiale en entonnoir s'évasant à partir du fond du micropuits, ces fonds étant séparés par des surfaces (9_i) convexes en tout point et dépourvues de toute discontinuité de courbure, ces surfaces présentant
5 en outre un fini de qualité optique.

11. Plaquette conforme à la revendication 10, caractérisée en ce que les fonds des micropuits (10_i) sont texturés.

12. Plaquette conforme à la revendication 10,
10 caractérisée en ce que les fonds des micropuits (10_i) portent des empreintes de marques de repérage en relief.

13. Plaquette conforme à la revendication 10, caractérisée en ce que le réseau de micropuits (10_i) comporte des lignes et des colonnes de micropuits
15 présentant des fonds de forme différente de celle des autres micropuits, ces lignes et colonnes assurant un maillage du réseau repérable optiquement.

14. Plaquette conforme à l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisée en ce qu'elle
20 comprend deux réseaux de micropuits ($10_i; 11_i$) formé chacun sur l'une de ses deux faces opposées, chacun des micropuits (10_i) d'un des réseaux étant coaxial à un des micropuits (11_i) de l'autre réseau, et chacun des micropuits d'un des réseaux étant conformé pour accueillir
25 un moyen de traitement ou d'observation (12) d'une culture pratiquée dans le micropuits (10_i) coaxial de l'autre réseau.

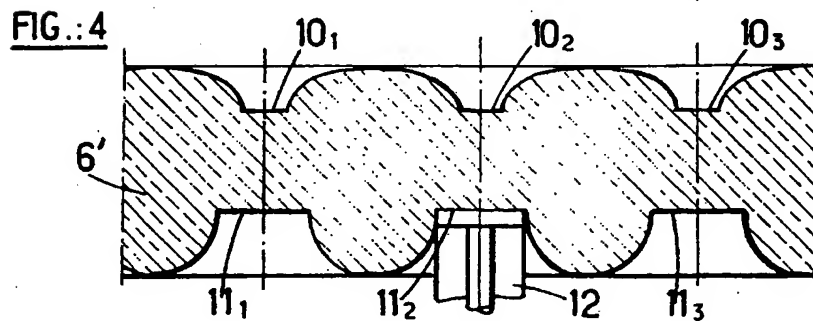
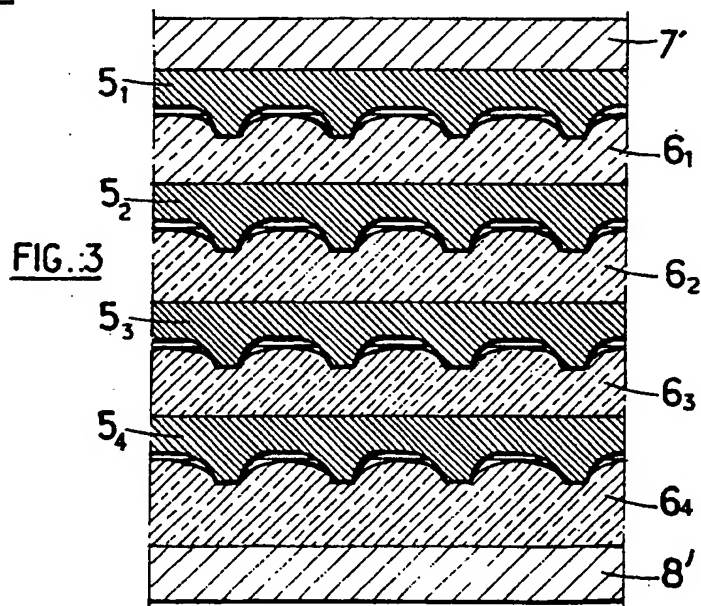
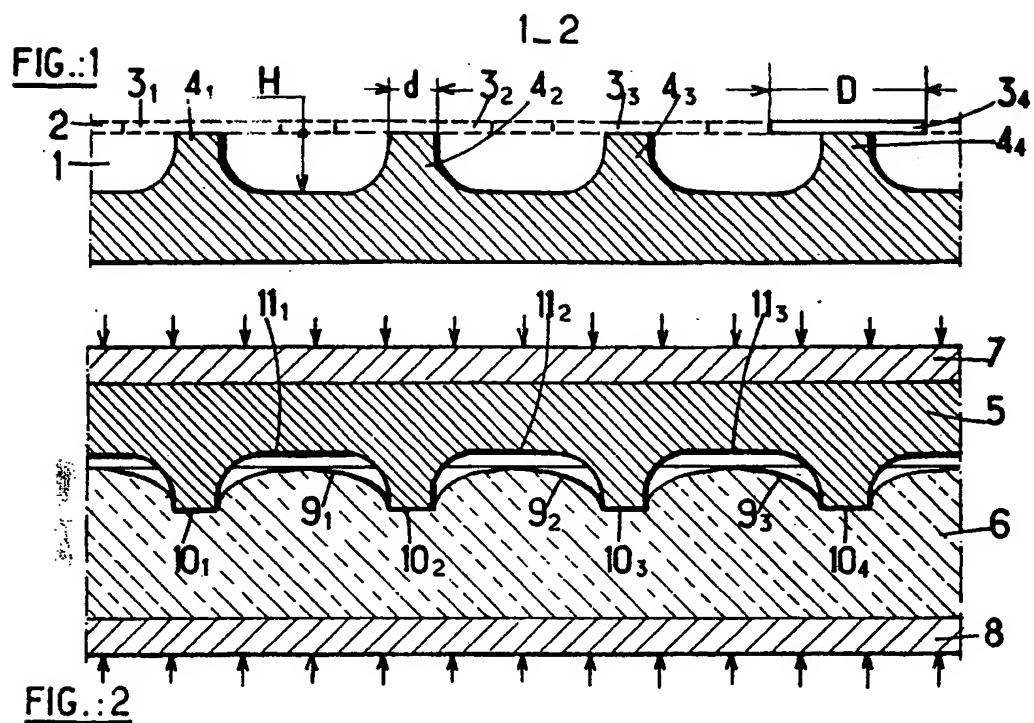
15. Plaquette conforme à la revendication 10, caractérisée en ce que ledit moyen d'observation (12) est
30 constitué par une extrémité d'une fibre optique.

16. Plaquette conforme à l'une quelconque des revendications 10 à 15, caractérisée en ce que les axes des puits (10_i) sont distants de 100 à 200 μm environ, la profondeur des puits étant comprise entre 15 et 30 μm

environ alors que le diamètre du fond du puits est compris entre 20 et 50 μm environ.

17. Plaquette conforme à l'une quelconque des revendications 10 à 16, caractérisée en ce qu'elle est
5 constituée en un matériau du groupe formé par : un matériau vitreux, un verre, une matière plastique, un métal ductile déformé plastiquement.

18. Matrice de pressage (5;5;) obtenue par le procédé conforme à la revendication 2.



2-2

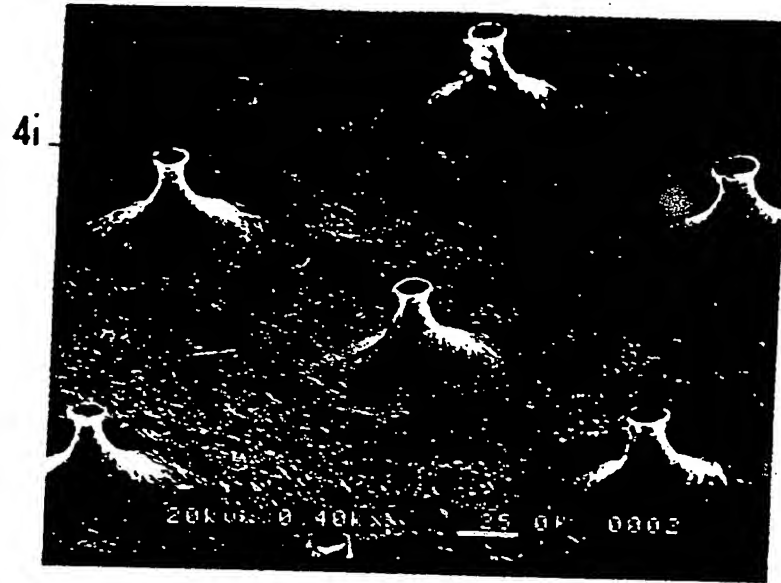
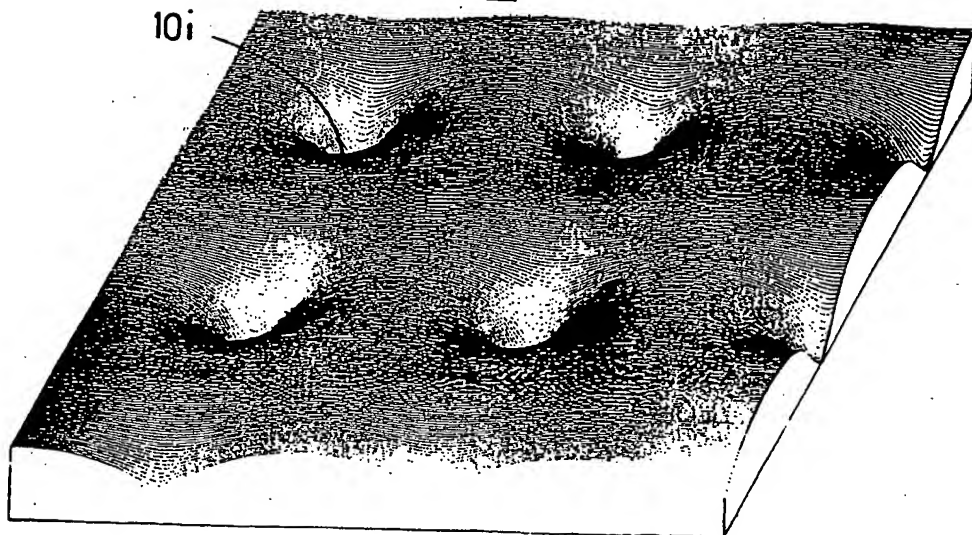


FIG. 5

FIG. 6



REPUBLIQUE FRANÇAISE

2741357

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 523273
FR 9513878

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	EP-A-0 580 112 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) * le document en entier *	1,3,8, 10,18	
X	US-A-3 961 929 (STOCKDALE) * le document en entier *	1,3,8, 10,18	
X	WO-A-89 05507 (PILKINGTON PLC) * le document en entier *	1	
A	FR-A-2 184 579 (CORNING GLASS WORKS) * le document en entier *	1,10,18	
A	FR-A-2 671 070 (SAINT-GOBAIN VITRAGE INTERNATIONAL) * le document en entier *	1,10,18	
A	EP-A-0 493 202 (SAINT-GOBAIN VITRAGE INTERNATIONAL) * le document en entier *	1,10,18	
A	JP-B-04 820 602 (NIPPON GLASS COMPANY LTD.) * le document en entier *	1,10,18	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
			C03B
Date d'achèvement de la recherche			Examineur
22 Juillet 1996			Van den Bossche, W
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>			
<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 OL12 (PO4C13)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)